

植物微生物相互作用の包括的解析

●田畑 哲之¹⁾ ◆中村 保一¹⁾ ◆川口 正代司²⁾ ◆佐伯 和彦³⁾

1) かずさ DNA 研究所 2) 東京大学大学院理学系研究科 3) 奈良女子大学理学部

＜研究の目的と進め方＞

植物-微生物間の相互作用メカニズムを解明する上で、共生現象は優れた研究材料である。また、養分吸収効率の上昇、耐病性の付加など宿主植物に利益を供与するため農業上の重要性も高い。マメ科植物の多くは自然界で根粒菌と共生関係を築いており、宿主特異性が高い、宿主とバクテリアの両者で新たな器官形成や大きな生理的变化が起こる、物質を介した複雑な相互作用がある、などの特徴をもつ。本研究は、マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定系を対象として、分子遺伝学的手法に加えてゲノム科学的手法を駆使することによって両者間の相互作用機作およびその遺伝的背景を明らかにすることを目的としている。

実験材料としては、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) - ミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) をモデル系として使用する。ミヤコグサでは、全ゲノム構造情報、900 を越える DNA マーカー、全ゲノムを 20 倍以上カバーする BAC ライブラリー、90,000 を越える EST 情報や cDNA クロウンが整備されている。また、EMS やイオンビームで処理したミヤコグサから多数の共生変異体を単離し、対応する遺伝子座の特定を進めている。本研究では、上記ゲノムリソースを活用して共生変異体の原因遺伝子を単離し、その機能を解明する。ミヤコグサ根粒菌については、全遺伝子の構造情報、全ゲノムをカバーするコスミド、プラスミドクローンを利用した遺伝子欠失系により、候補遺伝子の系統的な機能解析を進める。さらに、酵母 Two-hybrid 系によるタンパク質相互作用を改良し、共生窒素固定への寄与が予想される多数の遺伝子産物を対象に大規模な相互作用解析を行う。

＜2007 年度の研究の当初計画＞

これまでにマメ科植物の根粒形成において根粒菌の感染情報をシュートで感知する HAR1 レセプター様キナーゼのリガンド候補 *LjCLE1,2* をミヤコグサのゲノム情報より見出すことに成功した。本年度は *LjCLE1,2* の発現抑制体を作成し、その表現型を解析する。また *har1* 変異体と *LjCLE1,2* 発現抑制体を掛け合わせ、*LjCLE1,2* が HAR1 と遺伝的に同一経路で機能するかどうかを調べる。

ミヤコグサ根粒菌については、これまでに蓄積した Two-hybrid 解析やアレイ解析の情報をもとに系統的な遺伝子機能解析を進めるため、昨年度までに開発した Archive クロウンを利用した遺伝子破壊系を用いて年間 50 株以上の遺伝子破壊株を作製する。これと平行して、破壊株による遺伝子機能解析をサポートする目的で、STM 法を利用したミュタントライブラリーの作製を行う。さらに、昨年度までに宿主特異性を決める機能をもつことを示した 3 型分泌系に関して解析を進めるため、3 型分泌系の制御遺伝子 *tts1* の強制発現株、及び 3 型分泌系が活性化されるフラボノイド添加条件下でのトランスクリプトーム解析によりエフェクター候補を同定するとともに、宿主側因子との相互作用解析を実施する。また、改良した RIVET 法を用いた宿主植物への感染過程で発現誘導される遺伝子の解析を実施するとともに、候補遺伝子については archive クロウンを利用した GFP 融合標識株を作製し検証実験を実施する。

＜2007 年度の成果＞

HAR1 は根粒菌の分泌する Nod factor による負の制御系に必須の受容体型キナーゼである。今年度は、ミヤコグサのゲノム情報からそのリガンド候補を探索してきた。その結果 40 の候補遺伝子を検出し、その中から HAR1 依存的に根粒形成を抑制する 2 つのペプチド遺伝子 *LjCLE1*, *LjCLE2* を見出した。*LjCLE1*, *LjCLE2* の過剰発現による強い根粒抑制効果は、形質転換した根のみならず、それ以外の根にも伝達された。また、*LjCLE1*, *LjCLE2* の発現誘導には、Nod factor が必須であることを明らかにした。

根粒菌におけるタンパク質相互作用解析の結果、最終的に 1804 タンパク質 (全タンパク質の 24%) を含む 3121 の相互作用の候補を同定した。そして、遺伝子発現やオペロン構造、タンパク質の機能ドメインなどの情報を指標にして得られた相互作用情報を評価することにより、新規な共生窒素固定関連遺伝子の候補を多数同定した。

相互作用解析により同定した新規共生関連遺伝子の機能解析を効率化するため、トランスポゾンを利用したミヤコグサ根粒菌の大規模遺伝子破壊系の構築を行った。これまでに約 3 万クローンの変異株を収集しており、そのうち 9 千クローンの挿入位置を解析した結果、3156 種類の遺伝子への挿入変異が確認された。この挿入変異株を用いた遺伝子機能解析を進めるとともに、この遺伝子破壊系をリソースとして活用するためのデータベースの構築も行った。

フラボノイド添加条件下で、TypeIII 分泌系により培養上清に放出されるポリペプチド 11 種類を検出し、うち 5 種類について質量分析と特異抗体により同定した。特異抗体で検出されたうち、NopB については免疫電顕により TypeIII 分泌ニードルに付帯することを確認した。また、*nopA*, *nopB*, *nopC* と *nopX* の個別破壊株を作製して接種実験を行った結果は、いずれもが TypeIII 分泌装置を構成することを示唆した。

配列特異的リコンビナーゼ遺伝子を 1 次レポーターとし、その標的配列を遺伝子内部に埋め込んで薬剤耐性の切替を可能とする新規 2 次レポーター遺伝子を開発して併せ用い、汎用性の改良 RIVET 系を構築した。既知プロモーター領域によるモデル実験に成功したので、共生特異的に発現する遺伝子のクロニングを開始した。MAFF303099 株で作製した Primary ライブラリーを根粒菌レポーター株 EMD402 に導入して Starting ライブラリーを構築、ミヤコグサに接種し 3008 の根粒から菌株を個別に分離したところ、約 5% の株で組換えが起こっていた。

＜国内外での成果の位置づけ＞

根粒形成の全身制御に関しては海外でも精力的に研究が進められているが、このプロセスを仲介する受容体型キナーゼのリガンドを特定したという報告はない。また、*LjCLE1*, *LjCLE2* は、感染を受けた部位から遠距離移行して作用すると考えられるが、シロイヌナズナやイネでも遠距離移行を示唆する CLE ペプチドの報告例もない。今回ミヤコグサのゲノム情報より特定した 2 つの CLE ペプチドは、根粒形成のみならず菌の過剰感染を抑制する初めてのペプチド因子となることが期待される。

大規模なインタラクトーム解析を根粒菌で初めて実施し、その

成果を論文およびデータベース (RhizoBase) を通じて公開した。相互作用情報は、遺伝子産物どうしの機能的相互関係の解明に役立つ上、トランスクリプトームやプロテオーム解析と組み合わせることにより、遺伝子の機能予測やネットワーク解析への展開が期待され、国内外の研究コミュニティに利用され始めている。また、作製中のトランスポゾンを利用したミヤコグサ根粒菌の大規模遺伝子破壊株系統についても、国内研究者を中心に共同研究ベースで提供している。

タンパク質工学的アプローチにより、薬剤耐性の切替が可能な2次レポーター遺伝子を新規に構築した。これを用いた改良RIVET系は、positive-screening可能な汎用性のある第3世代のRIVETであり、世界でこれまで類を見ない。新規な共生遺伝子の同定を通じて有効性を実証する。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

根粒菌感染で顕著に発現が上昇する *LjCLE1*, *LjCLE2* をそれぞれ RNAi で発現抑制を試みたが、誘導性遺伝子のためか、効率よく発現を抑制することができなかった。*LjCLE1*, *LjCLE2* 両方のノックダウンを試みた系統の中に根粒数が若干増加する系統も観察されたが、明確な遺伝子機能を知るには至らなかった。逆遺伝学的手法の開発が強く望まれる。

大規模なタンパク質相互作用解析の結果を活用した遺伝子機能解析については、遺伝子破壊株の作製に時間を要したことから、進行が計画よりも遅れている。これに対応するための方策の一つとして、トランスポゾンを利用した大規模な遺伝子破壊系を新規に計画し、これまでにミヤコグサ根粒菌遺伝子の約4割に相当する破壊株を取得することができている。今後はこの破壊株集団を用いることにより遺伝子機能解析を効率化することができ、当初目標に沿った成果が得られることを期待している。

F1p リコンビナーゼ /FRT 系を用いた系統的破壊株の作製が、年度当初の計画より遅れている。これは、改良 RIVET 系を用いた新規共生遺伝子探索実験に多くの人的・時間的資源を費やしたためである。RIVET 系を用いた実験が軌道に乗ってきたので、今後は F1p リコンビナーゼ /FRT 系を用いた系統的破壊の遅れを取り戻せる見込みである。

50-mer オリゴアレイを用いて TypIII 分泌に関わる遺伝子のトランスクリプトーム解析を行う予定であったが、既知遺伝子の確認に留まっている。借用しているアレイスキャナーの故障と mRNA 標品の低回収率が主な原因で、現在、改善中である。

<今後の課題>

マメ科植物ではゲノム解析が広く進められているにもかかわらず、TILLING 以外の逆遺伝学的手法が確立されておらず、遺伝子機能解析が停滞している。そこで、ミヤコグサで遺伝子ターゲティングのシステムの構築を試みたい。遺伝子の導入には *Agrobacterium tumefaciens* を用い、効率のよい相同組換えカススの選抜方法を検討する。ターゲティングにはすでに機能が明らかにされている *HARI* などを用いる。平行して *LjCLE1*, *LjCLE2* のターゲティングを目指す。また、ミヤコグサとタルウマゴヤシのゲノムシンテナーを利用して新規根粒過剰着生変異体の原因遺伝子を特定する。

作製したミヤコグサ根粒菌の大規模遺伝子破壊系を用いて、相互作用情報から遺伝子機能解析を行う候補として選抜した 127 遺伝子についての解析を進める。機能解析は各遺伝子破壊株のミヤコグサへの接種実験により実施し、根粒形成能、窒素固定活性を指標に評価する。さらに、シングルクロスオーバーと部位特異的組換えを利用した遺伝子破壊系とも組み合わせ、より多くの遺伝子破壊株を取得し、解析候補遺伝子の機能解析や typeIII 系で分泌されるエフェクターの解析を実施する。

改良 RIVET 系を用いて得られたゲノム断片を配列決定し、初期感染から根粒維持の段階で特異的に発現する新規遺伝子を同定したい。さらに、同定した遺伝子に関し、STM 株ならびに個別

破壊株を利用して、共生における機能解析に着手する。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

- 0801232321
Okazaki, S., Hattori, Y., and Saeki, K.: The Mesorhizobium loti purB gene is involved in infection thread formation and nodule development in *Lotus japonicus*, *J. Bacteriol.*, 189, 8347-8352 (2007)
- 0707202003
Sato S, Nakamura Y, Asamizu E, Isoe S, Tabata S.: Genome sequencing and genome resources in model legumes, *Plant Physiol.*, 144, 588-593, (2007).
- 0707201953
Horst I, Welham T, Kelly S, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Parniske M, Wang TL.: TILLING mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase, *Plant Physiol.*, 144, 806-820, (2007).
- 0707201935
Shimada N, Sato S, Akashi T, Nakamura Y, Tabata S, Ayabe S, Aoki T.: Genome-wide Analyses of the Structural Gene Families Involved in the Legume-specific 5-Deoxyisoflavonoid Biosynthesis of *Lotus japonicus*, *DNA Res.*, 14,25-36(2007).
- 0707201920
Rubio MC, Becana M, Sato S, James EK, Tabata S, Spink HP.: Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*, *Mol Plant Microbe Interact.*, 20, 262-275 (2007).
- 0707201907
Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, Kouchi H, Murooka Y, Szczyglowski K, Downie JA, Parniske M, Hayashi M, Kawaguchi M.: NUCLEOPORIN85 Is Required for Calcium Spiking, Fungal and Bacterial Symbioses, and Seed Production in *Lotus japonicus*, *Plant Cell*, 19, 610-624 (2007).
- 0707201835
Kumagai H, Hakoyama T, Umehara Y, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Kouchi H.: A Novel Ankyrin-Repeat Membrane Protein, IG1, Is Required for Persistence of Nitrogen-Fixing Symbiosis in Root Nodules of *Lotus japonicus*, *Plant Physiol.*, 143, 1293-1305 (2007).
- 0702130244
Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, Radutoiu S, Albrechtsen AS, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Stougaard J.: A Gain-of-Function Mutation in a Cytokinin Receptor Triggers Spontaneous Root Nodule Organogenesis, *Science*, 315, 104-107(2007).
- 0801261228
Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L, Szczyglowski K.: A Cytokinin Perception Mutant Colonized by Rhizobium in the Absence of Nodule Organogenesis, *Science*, 315, 101-104 (2007).
- 0702130258
Takeda N, Kistner C, Kosuta S, Winzer T, Pitzschke A, Groth M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Parniske M.: Proteases in plant root symbiosis, *Phytochemistry*, 68,111-121 (2007).
(他、計13報)